

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/13856

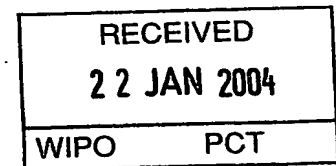
29.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 0 月 2 9 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 3 1 4 7 7 6  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 3 1 4 7 7 6 ]



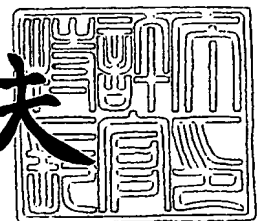
出 願 人            独立行政法人理化学研究所  
Applicant(s):        株式会社ダナフォーム  
                      湧永製薬株式会社

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   1 月   8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 13912401

【提出日】 平成14年10月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 核酸の増幅法

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 広島県高田郡甲田町下甲立 1 6 2 4 湧永製薬株式会社  
内

【氏名】 三 谷 康 正

【発明者】

【住所又は居所】 広島県高田郡甲田町下甲立 1 6 2 4 湧永製薬株式会社  
内

【氏名】 山 根 明 男

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町中央 8 - 3 - 1 株式会社ダナフォ  
ーム内

【氏名】 柴 田 裕 子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 2 2 - 8

【氏名】 林 崎 良 英

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

【氏名又は名称】 理化学研究所

## 【特許出願人】

【識別番号】 501293666  
【住所又は居所】 東京都港区三田 1 丁目 3 番 3 5 号  
【氏名又は名称】 株式会社 ダナフォーム

## 【特許出願人】

【識別番号】 000250100  
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原四丁目 5 番 3 6 号  
【氏名又は名称】 湧永製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100075812  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 吉 武 賢 次

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100091487  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中 村 行 孝

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100094640  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 紺 野 昭 男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100107342  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 横 田 修 孝

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 087654  
【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

【ブルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の増幅法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鋳型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成する方法であって、

(a) 標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (Ac') を 3' 末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなるプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(b) 鋳型核酸を用意する工程、

(c) 前記プライマーを前記鋳型核酸にアニーリングさせ、プライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む相補核酸を合成する工程、

(d) 工程 (c) により合成された相補核酸の 5' 側に存在する配列 (B') を同相補核酸上に存在する配列 (Bc) にハイブリダイズさせ、これにより、鋳型核酸上の前記配列 (A) の部分を一本鎖とする工程、および

(e) 工程 (d) により一本鎖とされた鋳型核酸上の前記配列 (A) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (c) により合成された相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、  
を含んでなる、方法。

【請求項 2】

工程 (e) により得られた二本鎖の核酸を工程 (d) で繰り返して使用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (c)、工程 (d) および工程 (e) が等温で行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼが使用される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

鋳型核酸が RNA である場合に、逆転写酵素を用いて cDNA を合成する工程をさらに含んでなる、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

二本鎖からなる鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法であって、

(a) 二本鎖鋳型核酸の第一鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (Ac') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(b) 二本鎖鋳型核酸の第二鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (C) にハイブリダイズする配列 (Cc') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (C) よりも 5' 側に存在する配列 (D) の相補配列 (Dc

) にハイブリダイズする配列 (D') を前記配列 (Cc') の 5' 側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Cc') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (C) と前記配列 (D) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(c) 第一の鋳型核酸および第二の鋳型核酸からなる二本鎖鋳型核酸を用意する工程、

(d) 前記第一および第二のプライマーをそれぞれ前記第一および第二の鋳型核酸にアニーリングさせ、それぞれプライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む第一および第二の相補核酸を合成する工程、

(e) 工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸の 5' 側に存在する配列 (B') および配列 (D') を、同相補核酸上に存在する配列 (Bc) および配列 (Dc) にそれぞれハイブリダイズさせ、これにより、第一および第二の鋳型核酸上の前記配列 (A) および配列 (C) の部分を一本鎖とする工程、ならびに

(f) 工程 (e) により一本鎖とされた第一および第二の鋳型核酸上の前記配列 (A) および配列 (C) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、  
を含んでなる、方法。

#### 【請求項 7】

工程 (f) により得られた二本鎖の核酸を工程 (e) で繰り返して使用する、請求項 6 に記載の方法。

#### 【請求項 8】

工程（f）により一本鎖の核酸として得られた第一および第二の相補核酸を、工程（d）においてそれぞれ第二および第一の鋳型核酸として繰り返して使用する、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

工程（d）、工程（e）および工程（f）が等温で行われる、請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼが使用される、請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

鋳型核酸が RNA の場合に、逆転写酵素を用いて c DNA を合成する工程をさらに含んでなる、請求項 6 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

鋳型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成するためのプライマーであって、

標的核酸配列の 3' 末端部分の配列（A）にハイブリダイズする配列（Ac'）を 3' 末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列（A）よりも 5' 側に存在する配列（B）の相補配列（Bc）にハイブリダイズする配列（B'）を前記配列（Ac'）の 5' 側に含んでなり、

プライマー中において前記配列（Ac'）と前記配列（B'）との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列（Ac'）の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列（A）と前記配列（B）に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列（Ac'）と前記配列（B'）との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にある、プライマー。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載のプライマーを含んでなる、鋳型核酸中の標的核酸配列と相



補的な核酸を合成するためのキット。

【請求項 14】

二本鎖からなる鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅するためのプライマーセットであって、

(a) 二本鎖鋳型核酸の第一鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (Ac') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にある、第一のプライマー、および

(b) 二本鎖鋳型核酸の第二鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (C) にハイブリダイズする配列 (Cc') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (C) よりも 5' 側に存在する配列 (D) の相補配列 (Dc) にハイブリダイズする配列 (D') を前記配列 (Cc') の 5' 側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Cc') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (C) と前記配列 (D) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にある、

第二のプライマー、  
を含んでなる、プライマーセット。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のプライマーセットを含んでなる、二本鎖からなる鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、遺伝子工学分野において有用な核酸配列の合成法および増幅法に関するものであり、より詳細には、鎖置換反応を利用した核酸配列の合成法および増幅法に関するものである。

【0002】

背景技術

遺伝子工学分野においては、遺伝的な特徴を直接的に分析しうる方法として、核酸配列の相補性に基づく分析が知られている。このような分析では、試料中に存在する目的遺伝子量が少ない場合には、一般にその検出が容易ではないため、目的遺伝子そのものを予め増幅することが必要となる。

【0003】

目的遺伝子の増幅（核酸増幅）は、主に、DNA ポリメラーゼを利用した酵素的方法により行われる。このような酵素的方法の主要なものとしては、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR 法；米国特許第 4683195 号明細書、米国特許第 4683202 号明細書および米国特許第 4800159 号明細書）、さらには、PCR 法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写 PCR 法（RT-PCR 法；Trends in Biotechnology 10, pp146-152, 1992）がある。これらの方法は、鋳型となる二本鎖核酸の一本鎖核酸への解離（変性）、一本鎖核酸へのプライマーのアニーリング、およびプライマーからの相補鎖合成（伸長）の 3 つの段階からなる反応を繰り返すことにより、DNA または RNA からの目的遺伝子の増幅を可能とするものである。これらの方法では、反応溶液を上記 3 段階のそれぞれ

れに適した温度に調節する計3工程の繰り返しが必要とされる。

#### 【0004】

上記の核酸増幅法において工程数を2工程とする改良法としては、シャトルPCR法（「PCR法最前線」、蛋白質 核酸 酵素 別冊、共立出版、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））が知られている。シャトルPCR法では、PCR法における3段階の反応のうち、プライマーのアニーリングおよび伸長の2段階が同一温度で行われるため、計2工程の反応により目的遺伝子を増幅することが可能となる。さらに、欧州特許出願公開第0320308号明細書には、リガーゼ連鎖反応法（LCR法）が開示されており、該方法では、耐熱性のDNAリガーゼを用いて2工程の温度サイクリング反応（加熱と冷却の繰り返し反応）を行うことにより既知の遺伝子配列が増幅される。

#### 【0005】

以上に記載した方法においては、広い温度範囲で、かつ、厳密な温度制御を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2種類～3種類の温度条件で行なうために、各反応温度に調整するための時間が必要であり、サイクル数が増えれば増えるほど、それに要する時間は増大する。

#### 【0006】

上記問題点を解決すべく、等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発されている。このような方法としては、例えば、特公平7-114718号公報（特許文献1）に記載の鎖置換型増幅（SDA；strand displacement amplification）法、自立複製（3SR；self-sustained sequence replication）法、日本国特許第2650159号公報（特許文献2）に記載の核酸配列増幅（NASBA；nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（transcription-mediated amplification）法、日本国特許第2710159号公報（特許文献3）に記載のQベータレプリカーゼ法、米国特許第5824517号明細書（特許文献4）、国際公開第99/09211号パンフレット（特許文献5）または国際公開第95/25180号パンフレット（特許文献6）に記載の種々の改良SDA法、国際公開第00/28082号パンフレット（特許文献7）に記載のランプ法（

Loop-Mediated Isothermal Amplification)、国際公開第02/16639号パンフレット(特許文献8)に記載のアイキャン法(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids)等が挙げられる。これらの等温核酸増幅法に関与する全段階の反応は一定の温度に保たれた反応混合物中で同時に進行する。

#### 【0007】

SDA法では、最終的にDNAが増幅される系において、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼが介する二本鎖の置換により、試料中の目的核酸(およびその相補鎖)の増幅が可能となる。該方法では、4種類のプライマーが必要とされ、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように設計する必要がある。また、該方法では、核酸合成のための基質として、修飾されたデオキシヌクレオチド3リン酸、例えば3リン酸部分の $\alpha$ 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子(S)に置換されたデオキシヌクレオチド3リン酸が必要とされる。従って、該方法は、高いランニングコストを必要とする。さらに該方法では、増幅された核酸断片中に修飾ヌクレオチド、たとえば $\alpha$ S置換デオキシヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅断片を制限酵素断片長多型(RFLP; restriction enzyme fragment length polymorphism)解析に供しようとする場合に、該増幅断片が制限酵素で切断できないことがあり、よって、そのような解析を実施できない場合がある。

#### 【0008】

米国特許第5824517号明細書(特許文献4)に記載の改良SDA法は、RNAとDNAから構成され、3'末端側がDNAであるキメラプライマーを必要とする。そのようなRNAとDNAから構成されるキメラプライマーはその合成にかかる費用が高く、また、RNAを含むプライマーはその取り扱いに専門的な知識を必要とする。また、国際公開第99/09211号パンフレット(特許文献5)に記載の改良SDA法は、5'突出末端を生じさせる制限酵素を必要とし、さらに、国際公開第95/25180号パンフレット(特許文献6)に記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマー対を必要とするため、これらの方法は高いランニングコストを必要とする。

## 【0009】

アイキャン法では、RNAとDNAから構成され、3'末端側がRNAであるキメラプライマー、さらには、そのプライマーの3'末端のRNA部分を切断するRNase Hが必要とされるため、必要な試薬のための費用が高価となる。そのため、この方法は、特に大量のサンプルについての遺伝子検査等において、高いランニングコストを必要とする。

## 【0010】

ランプ法では、4種類のプライマーが必要とされ、それらが6個所の領域を認識することにより、目的遺伝子の増幅が可能となる。すなわち、この方法では、まず、第一のプライマーが鋳型鎖にアニーリングして伸長反応が起こり、この第一のプライマーの構成に起因して伸長鎖の5'末端部分でステムループ構造が形成される。次に、第一のプライマーよりも上流側に設計された第二のプライマーによる鎖置換反応により第一のプライマーによる伸長鎖が鋳型鎖から分離する。これと同様の反応が二本鎖核酸のもう一方の鎖についても行なわれ、これらの反応が繰り返されることにより、標的核酸が増幅される。従って、ランプ法では増幅反応の作用機序が複雑となり、さらには必ず6個所の領域を選定しなければならないため、プライマーの設計が困難となる。また、4種類のプライマーのうち、2種類は比較的長鎖のプライマーが必要とされるため、プライマーの合成およびその精製に費用と時間がかかる。

## 【0011】

従って、低いランニングコストで実施でき、かつ得られた核酸断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することを可能とする核酸増幅法が求められている。特に、一对のプライマーで速やかに増幅可能な等温核酸増幅法が望まれる。

## 【0012】

## 【特許文献1】

特公平7-114718号公報

## 【特許文献2】

日本国特許第2650159号公報

## 【特許文献3】

日本国特許第 2710159 号公報

【特許文献 4】

米国特許第 5824517 号明細書

【特許文献 5】

国際公開第 99/09211 号パンフレット

【特許文献 6】

国際公開第 95/25180 号パンフレット

【特許文献 7】

国際公開第 00/28082 号パンフレット

【特許文献 8】

国際公開第 02/16639 号パンフレット

【0013】

【発明の概要】

本発明者らは、鎖置換反応を利用した核酸の増幅法において、該方法に使用されるステムループ形成可能なプライマーを特定の条件を満たすように設計することにより、1種のプライマーを用いて標的核酸配列と相補的な核酸配列を含む核酸を合成でき、さらには、2種のプライマーを用いて効率的に標的核酸を増幅できることを見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

【0014】

従って、本発明は、標的核酸配列を含む核酸を効率的に合成または増幅する方法、ならびにこれらの方法に用いられるプライマーまたはプライマーセットを提供することを目的とする。

【0015】

そして、本発明による核酸合成法は、鋳型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成する方法であって、

(a) 標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (Ac') を 3' 末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなるプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X-Y)/X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(b) 鋳型核酸を用意する工程、

(c) 前記プライマーを前記鋳型核酸にアニーリングさせ、プライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む相補核酸を合成する工程、

(d) 工程 (c) により合成された相補核酸の 5' 側に存在する配列 (B') を同相補核酸上に存在する配列 (Bc) にハイブリダイズさせ、これにより、鋳型核酸上の前記配列 (A) の部分を一本鎖とする工程、および

(e) 工程 (d) により一本鎖とされた鋳型核酸上の前記配列 (A) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (c) により合成された相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、を含んでなる方法である。

#### 【0016】

また、本発明による核酸増幅法は、二本鎖からなる鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法であって、

(a) 二本鎖鋳型核酸の第一鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (Ac') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中にお

ける前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、  
 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(b) 二本鎖鋳型核酸の第二鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (C) にハイブリダイズする配列 (Cc') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (C) よりも 5' 側に存在する配列 (D) の相補配列 (Dc) にハイブリダイズする配列 (D') を前記配列 (Cc') の 5' 側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Cc') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (C) と前記配列 (D) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、  
 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程、

(c) 第一の鋳型核酸および第二の鋳型核酸からなる二本鎖鋳型核酸を用意する工程；

(d) 前記第一および第二のプライマーをそれぞれ前記第一および第二の鋳型核酸にアニーリングさせ、それぞれプライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む第一および第二の相補核酸を合成する工程、

(e) 工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸の 5' 側に存在する配列 (B') および配列 (D') を、同相補核酸上に存在する配列 (Bc) および配列 (Dc) にそれぞれハイブリダイズさせ、これにより、第一および第二の鋳型核酸上の前記配列 (A) および配列 (C) の部分を一本鎖とする工程、ならびに

(f) 工程 (e) により一本鎖とされた第一および第二の鋳型核酸上の前記配列



(A) および配列 (C) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程、  
を含んでなる方法である。

#### 【0017】

さらに、本発明によるプライマーは、鋳型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成するためのプライマーであって、

標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (Ac') を 3' 末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、  
 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、  
 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーである。

#### 【0018】

さらに、本発明によるプライマーセットは、二本鎖からなる鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅するためのプライマーセットであって、

(a) 二本鎖鋳型核酸の第一鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 (Ac') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (A) よりも 5' 側に存在する配列 (B) の相補配列 (Bc) にハイブリダイズする配列 (B') を前記配列 (Ac') の 5' 側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が

存在しない場合には、前記配列 (Ac') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Ac') と前記配列 (B') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にある、第一のプライマー、および

(b) 二本鎖鋳型核酸の第二鎖における標的核酸配列の 3' 末端部分の配列 (C) にハイブリダイズする配列 (Cc') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (C) よりも 5' 側に存在する配列 (D) の相補配列 (Dc) にハイブリダイズする配列 (D') を前記配列 (Cc') の 5' 側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Cc') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (C) と前記配列 (D) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にある、第二のプライマー、  
を含んでなるプライマーセットである。

【0019】

#### 【発明の具体的説明】

本発明によれば、DNA または RNA を鋳型として、1 本のオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより、等温条件下で連続して標的 DNA を合成することが可能となる。また、本発明によれば、DNA または RNA を鋳型として、1 対のオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより、等温条件下で連続して標的 DNA を増幅することが可能となる。従って、本発明による方法は、サーマルサイクラー等の特別な装置を必要とせず、また、温度設定に要する時間も必

要ないため、短時間で増幅産物が得られるという優れた効果を奏する。さらに、本発明に従って増幅されたDNA断片は、制限酵素処理することができるため、制限酵素断片長多型や変異検出等の遺伝子検査の領域において利用可能である。

#### 【0020】

本発明による核酸合成の作用機序を、図1に模式的に示す。まず、鋳型となる核酸中の標的核酸配列を決定し、その標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)、および配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)を決定する。本発明によるプライマーは、配列(Ac')を含んでなり、さらにその5'側に配列(B')を含んでなる。配列(Ac')は、配列(A)にハイブリダイズするものである。配列(B')は、配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズするものである。ここで、本発明によるプライマーは、前記配列(Ac')と前記配列(B')の間に、反応に影響を与えない介在配列を含んでいてもよい。このようなプライマーを鋳型核酸にアニーリングさせると、プライマー中の配列(Ac')が標的核酸配列の配列(A)にハイブリダイズした状態となる(図1(a))。この状態でプライマー伸長反応が起こると、標的核酸配列の相補配列を含む核酸が合成される。そして、合成された核酸の5'末端側に存在する配列(B')が、同核酸中に存在する配列(Bc)にハイブリダイズし、これにより、合成された核酸の5'末端部分においてステムループ構造が形成される。その結果、鋳型核酸上の配列(A)が一本鎖となり、この部分に先のプライマーと同一の配列を有する他のプライマーがハイブリダイズする(図1(b))。その後、鎖置換反応により、新たにハイブリダイズしたプライマーからの伸長反応が起こると同時に、先に合成された核酸が鋳型核酸から分離される(図1(c))。

#### 【0021】

上記の作用機序において、配列(B')が配列(Bc)にハイブリダイズする現象は、同一鎖上に相補領域が存在することにより起こる。一般に、二本鎖核酸が一本鎖に解離するときは、その末端あるいはそれ以外の比較的不安定な部分から部分的な解離が始まる。上記プライマーによる伸長反応で生成した二本鎖核酸は、比較的高温では末端部分の塩基対は解離と結合の平衡状態にあり、全体としては二本鎖を保っている。そのような状態で末端の解離した部分に相補的な配列が同

一鎖上に存在すると、準安定な状態としてステムループ構造を形成することができる。このステムループ構造は安定的には存在しないが、その構造の形成により剥き出しとなった相補鎖部分（鋳型核酸上の配列（A））に同一のプライマーが結合し、すぐさまポリメラーゼが伸長反応を行うことにより、先に合成した鎖が置換されて遊離すると同時に、新たな二本鎖核酸が生成する。

### 【0022】

以上の反応を繰り返すことにより、鋳型核酸中の標的核酸配列に相補的な核酸を大量に合成することが可能となる。また、上記の鋳型核酸の相補鎖を鋳型として同様の核酸合成を行なうこともできる。従って、本発明によれば、二本鎖の鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅することも可能となる。

### 【0023】

本発明による核酸合成法は、以下の工程を含んでなる：

（a）標的核酸配列の3'末端部分の配列（A）にハイブリダイズする配列（Ac'）を3'末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列（A）よりも5'側に存在する配列（B）の相補配列（Bc）にハイブリダイズする配列（B'）を前記配列（Ac'）の5'側に含んでなるプライマーであって、

プライマー中において前記配列（Ac'）と前記配列（B'）との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列（Ac'）の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列（A）と前記配列（B）に挟まれた領域の塩基数をYとしたときに、 $(X-Y)/X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあり、

プライマー中において前記配列（Ac'）と前記配列（B'）との間に介在配列が存在する場合には、XおよびYを前記の通りとし、該介在配列の塩基数をY'としたときに、 $\{X - (Y - Y')\}/X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあるプライマーを用意する工程；

（b）鋳型核酸を用意する工程；

（c）前記プライマーを前記鋳型核酸にアニーリングさせ、プライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む相補核酸を合成する工程；

（d）工程（c）により合成された相補核酸の5'側に存在する配列（B'）を同相補核酸上に存在する配列（Bc）にハイブリダイズさせ、これにより、鋳型核酸

上の前記配列 (A) の部分を一本鎖とする工程; および

(e) 工程 (d) により一本鎖とされた鋳型核酸上の前記配列 (A) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (c) により合成された相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程。

#### 【0024】

本発明において「ハイブリダイズする」とは、本発明によるプライマーの一部がストリンジেন্টな条件下で標的核酸にハイブリダイズし、標的核酸以外の核酸分子にはハイブリダイズしないことを意味する。ストリンジेंटな条件は、本発明によるプライマーとその相補鎖との二重鎖の融解温度  $T_m$  (°C) およびハイブリダイゼーション溶液の塩濃度などに依存して決定することができ、例えば、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis; Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)等を参照することができる。例えば、使用するプライマーの融解温度よりわずかに低い温度下でハイブリダイゼーションを行なうと、プライマーを標的核酸に特異的にハイブリダイズさせることができる。このようなプライマーは、市販のプライマー構築ソフト、例えば、Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research社製) などを用いて設計することができる。本発明の好ましい実施態様によれば、ある標的核酸にハイブリダイズするプライマーは、その標的核酸に相補的な核酸分子の全部または一部の配列を含んでなるものである。

#### 【0025】

上記工程 (a) において用意される本発明によるプライマーは、工程 (c) における鋳型核酸へのアニーリング、工程 (d) における配列 (B') と配列 (Bc) とのハイブリダイゼーション、および同一配列を有する他のプライマーがアニーリングしうる一本鎖の配列 (A) の提供を可能とするように構成されている。以下、これらの工程を良好に行なうためのプライマーの構成について、さらに詳細に説明する。

#### 【0026】

上記工程 (e) において新たなプライマーが効率よくアニーリングするために

は、工程 (c) により合成された相補核酸の工程 (d) におけるステムループ構造形成により、鋳型核酸上の前記配列 (A) の部分を一本鎖とする必要がある。そのためには、配列 (Ac') の塩基数  $X$  と標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数  $Y$  との差  $(X - Y)$  の、 $X$  に対する割合  $(X - Y) / X$  が重要となる。ただし、鋳型核酸上において配列 (A) よりも 5' 側に存在する、プライマーのハイブリダイズとは関係無い部分まで一本鎖とする必要はない。また、上記工程 (e) において新たなプライマーが効率よくアニーリングするためには、工程 (c) により合成された相補核酸の工程 (d) におけるステムループ構造形成を効率よく行なうことが必要となる。そして、効率の良いステムループ構造形成、すなわち、効率の良い配列 (B') と配列 (Bc) とのハイブリダイゼーションには、前記配列 (B') と前記配列 (Bc) との間の距離  $(X + Y)$  が重要となる。一般に、プライマー伸長反応のための最適温度は最高でも 72℃ 付近であり、そのような低い温度では伸長鎖の長い領域にわたって解離することは困難である。従って、配列 (B') が配列 (Bc) に効率よくハイブリダイズするためには、両配列の間の塩基数は少ないほうが好ましいと考えられる。一方で、配列 (B') が配列 (Bc) にハイブリダイズして鋳型核酸上の前記配列 (A) の部分を一本鎖とするためには、配列 (B') と配列 (Bc) との間の塩基数は多い方が好ましいと考えられる。

#### 【0027】

以上のような観点から、プライマーを構成する配列 (Ac') と配列 (B') の間に介在配列が存在しない場合において、本発明によるプライマーは、 $(X - Y) / X$  が -1.00 以上、好ましくは 0.00 以上、さらに好ましくは 0.05 以上、さらに好ましくは 0.10 以上となり、また、1.00 以下、好ましくは 0.75 以下、さらに好ましくは 0.50 以下、さらに好ましくは 0.25 以下となるように設計される。さらに、 $(X + Y)$  は、好ましくは 15 以上、さらに好ましくは 20 以上、さらに好ましくは 30 以上とされ、また、好ましくは 50 以下、さらに好ましくは 48 以下、さらに好ましくは 42 以下とされる。

#### 【0028】

また、プライマーを構成する配列 (Ac') と配列 (B') の間に介在配列 (塩基

数は  $Y'$  ) が存在する場合には、本発明によるプライマーは、 $|X - (Y - Y')$   
 $| \nearrow X$  が  $-1.00$  以上、好ましくは  $0.00$  以上、さらに好ましくは  $0.05$  以上、さらに好ましくは  $0.10$  以上となり、また、 $1.00$  以下、好ましくは  $0.75$  以下、さらに好ましくは  $0.50$  以下、さらに好ましくは  $0.25$  以下となるように設計される。さらに、 $(X + Y + Y')$  は、好ましくは  $15$  以上、さらに好ましくは  $20$  以上、さらに好ましくは  $30$  以上とされ、また、好ましくは  $100$  以下、さらに好ましくは  $75$  以下、さらに好ましくは  $50$  以下とされる。

#### 【0029】

本発明によるプライマーは、デオキシヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドにより構成されており、与えられた条件下で必要な特異性を維持しながら標的核酸との塩基対結合を行うことができる程度の鎖長を有するものである。本発明によるプライマーの鎖長は、好ましくは  $15 \sim 100$  ヌクレオチド、より好ましくは  $30 \sim 60$  ヌクレオチドとする。また、本発明によるプライマーを構成する配列 ( $Ac'$ ) と配列 ( $B'$ ) の長さは、それぞれ、好ましくは  $5 \sim 50$  ヌクレオチド、より好ましくは  $10 \sim 30$  ヌクレオチドである。また、必要に応じて、配列 ( $Ac'$ ) と配列 ( $B'$ ) の間に、反応に影響を与えない介在配列を挿入してもよい。

#### 【0030】

本発明において、「リボヌクレオチド」(単に「N」ということもある)とは、リボヌクレオチド3リン酸をいい、例えば、ATP, UTP, CTP, GTP 等がある。さらに、リボヌクレオチドにはこれらの誘導体が含まれ、例えば、 $\alpha$  位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えたリボヌクレオチド ( $\alpha$ -チオールリボヌクレオチド) 等がある。

#### 【0031】

また、本発明によるプライマーには、未修飾デオキシヌクレオチドおよび／または修飾デオキシヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドプライマー、および未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドプライマー、未修飾デオキシヌクレオチドおよび／または修

飾デオキシヌクレオチドおよび未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー等も含まれる。

#### 【0032】

本発明によるプライマーは、オリゴヌクレオチドの合成に用いることのできる任意の方法、例えば、リン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等により合成できる。本発明によるプライマーは、例えば、ABI社（Applied Biosystem Inc.）のDNAシンセサイザー394型を用いてホスホアミダイト法により合成すれば、容易に取得することができる。

#### 【0033】

本発明による核酸合成方法において使用するDNAポリメラーゼは、鎖置換（strand displacement）活性（鎖置換能）を有するものであればよく、常温性、中温性、もしくは耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。また、このDNAポリメラーゼは、天然体もしくは人工的に変異を加えた変異体のいずれであってもよい。さらに、このDNAポリメラーゼは、実質的に5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有しないものであることが好ましい。このようなDNAポリメラーゼとしては、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*、以下「B. s t」という）、バチルス・カルドテナックス（*Bacillus caldoteanax*、以下「B. c a」という）等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体、大腸菌（*E. coli*）由来DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント等が挙げられる。

#### 【0034】

本発明による核酸合成方法において使用するその他の試薬としては、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム等の触媒、dNTPミックス等の基質、トリス塩酸バッファー、トライシンバッファー、リン酸ナトリウムバッファー、リン酸カリウムバッファー等の緩衝液を使用することができる。さらに、ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide）やベタイン（N, N, N-trimethylglycine）等の添加物、国際公開第99/54455号パンフレットに記載の酸性物質、陽イオン錯体等を使用してもよい。

#### 【0035】



本発明による核酸合成方法において鋳型となる核酸は、DNAまたはRNAのどちらでもよい。これらの核酸は、例えば、血液、組織、細胞、さらには動物、植物のような生体由来試料、または食品、土壌、排水等から分離された微生物由来試料から単離することができる。

#### 【0036】

鋳型核酸の単離は任意の方法で行うことができ、例えば、界面活性剤による溶解処理、音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌およびフレンチプレス等を用いる方法が挙げられる。また、内在性ヌクレアーゼが存在する場合には、単離された核酸を精製することが好ましい。核酸の精製は、例えば、フェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動、密度に依存した遠心分離などにより実施することが可能である。

#### 【0037】

より具体的には、本発明による核酸合成方法における鋳型核酸としては、上記方法により単離したゲノムDNAやPCRフラグメントのような二本鎖核酸、全RNAもしくはmRNAから逆転写反応で調製されたcDNAのような一本鎖核酸のいずれも使用可能である。上記二本鎖核酸の場合は、変性工程 (denaturing) を行なって一本鎖とすることにより、より最適に利用することができる。

#### 【0038】

上記の逆転写反応に用いられる酵素は、RNAを鋳型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定されず、例えば、トリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素 (AMV RTase)、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素 (RAV-2 RTase)、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素 (MMLV RTase) 等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することも可能である。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が最適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ (Tth DNAポリメラーゼ等)、バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に好ましい酵素を例示すれば、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼとして、B. st 由来DNAポリメラーゼ (Bst DNAポリメラーゼ)、およびB. ca 由来DNAポリメ

ーゼ (B c a DNAポリメラーゼ)、例えばB c a B E S T DNAポリメラーゼ、が挙げられる。例えば、B c a DNAポリメラーゼは、反応にマンガンイオンを必要とせず、高温条件下で鋳型RNAの二次構造形成を抑制しながらcDNAを合成することが可能である。

#### 【0039】

さらに、本発明による核酸合成方法は、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼ、例えば、B c a B E S T DNAポリメラーゼを使うことにより、全RNAもしくはmRNAからの逆転写反応とcDNAを鋳型にしたDNAポリメラーゼ反応を1種類のポリメラーゼで行なうことが可能である。

#### 【0040】

本発明による核酸合成方法では、鋳型核酸が二本鎖核酸の場合でも、これをそのまま反応に用いることができるが、必要に応じてそれらを変性して一本鎖にすることにより、鋳型核酸へのプライマーのアニーリングを効率よく行なうこともできる。温度を約95℃に上昇させることは、好ましい核酸変性法である。他の方法として、pHを上昇させることにより変性させることも可能であるが、この場合には、プライマーを標的核酸にハイブリダイズさせるためにpHを低下させる必要がある。

#### 【0041】

本発明の好ましい実施態様によれば、工程(e)により得られた二本鎖の核酸は工程(d)で繰り返して使用される。すなわち、工程(e)により得られた二本鎖の核酸は工程(c)により得られるものと同一の構造を有するため、そのまま工程(d)において利用される。これにより、鋳型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を量産することができる。

#### 【0042】

本発明による核酸合成方法の特徴の一つは、等温で実施可能であることである。従って、本発明によれば、鋳型核酸中の標的核酸配列と相補的な核酸を合成する方法であって、鋳型核酸と本発明によるプライマーとを含んでなる核酸合成用溶液を用意する工程、およびこの核酸合成用溶液を等温でインキュベートする工程を含んでなる方法が提供される。ここで、「等温」とは、酵素およびプライマ

ーが実質的に機能しうるような、ほぼ一定の温度条件下に保つことをいう。

#### 【0043】

本発明による核酸合成方法は、使用する酵素の活性を維持できる温度に保つことにより実施することができる。また、本発明による核酸合成方法において、プライマーが標的核酸にアニーリングするためには、例えば、反応温度を、そのプライマーの融解温度 ( $T_m$ ) 付近の温度、もしくはそれ以下に設定することが好ましく、さらには、プライマーの融解温度 ( $T_m$ ) を考慮し、ストリンジェンシーのレベルを設定することが好ましい。従って、この温度は、好ましくは、約  $20^{\circ}\text{C}$  ~ 約  $75^{\circ}\text{C}$  であり、さらに好ましくは、約  $35^{\circ}\text{C}$  ~ 約  $65^{\circ}\text{C}$  とする。

#### 【0044】

本発明による核酸合成方法において、二本鎖からなる核酸を鋳型とし、その各鎖に対して設計した2種の本発明によるプライマーからなるプライマーセットを用いることにより、前記核酸中の標的核酸配列を増幅することができる。従って、本発明によれば、二本鎖からなる鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法が提供され、この核酸増幅方法は以下の工程を含んでなる：

(a) 二本鎖鋳型核酸の第一鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列 (A) にハイブリダイズする配列 ( $Ac'$ ) を3'末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (A) よりも5'側に存在する配列 (B) の相補配列 ( $Bc$ ) にハイブリダイズする配列 ( $B'$ ) を前記配列 ( $Ac'$ ) の5'側に含んでなる第一のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 ( $Ac'$ ) と前記配列 ( $B'$ ) との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 ( $Ac'$ ) の塩基数を  $X$  とし、標的核酸配列中における前記配列 (A) と前記配列 (B) に挟まれた領域の塩基数を  $Y$  としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 ( $Ac'$ ) と前記配列 ( $B'$ ) との間に介在配列が存在する場合には、 $X$  および  $Y$  を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を  $Y'$  としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程；

(b) 二本鎖鋳型核酸の第二鎖における標的核酸配列の3'末端部分の配列 (C

）にハイブリダイズする配列 (Cc') を 3' 末端部分に含んでなり、前記標的核酸配列において前記配列 (C) よりも 5' 側に存在する配列 (D) の相補配列 (Dc) にハイブリダイズする配列 (D') を前記配列 (Cc') の 5' 側に含んでなる第二のプライマーであって、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在しない場合には、前記配列 (Cc') の塩基数を X とし、標的核酸配列中における前記配列 (C) と前記配列 (D) に挟まれた領域の塩基数を Y としたときに、 $(X - Y) / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあり、

プライマー中において前記配列 (Cc') と前記配列 (D') との間に介在配列が存在する場合には、X および Y を前記の通りとし、該介在配列の塩基数を Y' としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$  が  $-1.00 \sim 1.00$  の範囲にあるプライマーを用意する工程；

(c) 第一の鋳型核酸および第二の鋳型核酸からなる二本鎖鋳型核酸を用意する工程；

(d) 前記第一および第二のプライマーをそれぞれ前記第一および第二の鋳型核酸にアニーリングさせ、それぞれプライマー伸長反応を行なって前記標的核酸配列の相補配列を含む第一および第二の相補核酸を合成する工程；

(e) 工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸の 5' 側に存在する配列 (B') および配列 (D') を、同相補核酸上に存在する配列 (Bc) および配列 (Dc) にそれぞれハイブリダイズさせ、これにより、第一および第二の鋳型核酸上の前記配列 (A) および配列 (C) の部分を一本鎖とする工程；ならびに

(f) 工程 (e) により一本鎖とされた第一および第二の鋳型核酸上の前記配列 (A) および配列 (C) の部分に、前記プライマーと同一の配列を有する他のプライマーをアニーリングさせて鎖置換反応を行なうことにより、工程 (d) により合成された第一および第二の相補核酸を、前記他のプライマーにより新たに合成される相補核酸で置換する工程。

#### 【0045】

なお、プライマーの設計、反応条件等の詳細は、本発明による核酸合成方法について上記した通りである。

## 【0046】

本発明の好ましい実施態様によれば、本発明による核酸増幅方法において、工程（f）により得られた二本鎖の核酸は工程（e）で繰り返して使用される。すなわち、工程（f）により得られた二本鎖の核酸は工程（d）により得られるものと同一の構造を有するため、そのまま工程（e）において利用される。

## 【0047】

他の好ましい実施態様によれば、本発明による核酸増幅方法において、工程（f）により一本鎖の核酸として得られた第一および第二の相補核酸は、工程（d）においてそれぞれ第二および第一の鋳型核酸として繰り返して使用される。すなわち、工程（f）により得られた第一の相補核酸は工程（d）における第二の鋳型核酸として利用され、工程（f）により得られた第二の相補核酸は工程（d）における第一の鋳型核酸として利用される。

## 【0048】

本発明による核酸増幅方法は、本発明による核酸合成方法と同様に等温で実施可能である。従って、本発明によれば、二本鎖からなる鋳型核酸中の標的核酸配列を増幅する方法であって、二本鎖鋳型核酸と本発明によるプライマーセットとを含んでなる核酸増幅用溶液を用意する工程、およびこの核酸増幅用溶液を等温でインキュベートする工程を含んでなる方法が提供される。ここで、「等温」とは、酵素およびプライマーが実質的に機能しうるような、ほぼ一定の温度条件下に保つことをいう。その温度条件の詳細については、本発明による核酸合成方法に関して上述したとおりである。

## 【0049】

本発明による核酸増幅方法においては、逆転写酵素活性を持つDNAポリメラーゼ、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼを使用すると、RNAを鋳型とする場合においても、該RNAからcDNAを調製する工程を含む核酸増幅方法として最適に実施できる。また、RNAからcDNAを調製する工程を独立させて行い、その生成物を本発明による核酸増幅方法に使用してもよい。

## 【0050】

本発明による核酸合成方法および核酸増幅方法においては、酵素が失活するか

、またはプライマーをはじめとする試薬のうちの一つが使い尽くされるかのいずれかまで合成反応または増幅反応が繰り返される。

#### 【0051】

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法を使用することにより、DNAチップに固定するための一本鎖核酸、塩基配列決定のための一本鎖DNAプローブ、または長鎖PCR法のためのメガプライマーを、簡便かつ迅速に作製することができる。例えば、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法を使用することにより、目的に応じて、センス配列のみ、あるいはアンチセンス配列のみを選択して増幅させることが可能である。従って、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法は、ある標的核酸のセンス配列またはアンチセンス配列の製造方法としても有用である。

#### 【0052】

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法によって得られた増幅産物の存在は、多くのあらゆる方法により検出が可能である。一つの方法は、一般的なゲル電気泳動による特定のサイズの増幅産物の検出である。この方法では、例えば、エチジウムブロマイドやサイバーグリーン等の蛍光物質により検出できる。他の方法としては、ビオチンのような標識を有する標識プローブを用い、これを増幅産物にハイブリダイズさせることにより検出することもできる。ビオチンは、蛍光標識されたアビジン、ペルオキシダーゼのような酵素に結合したアビジン等との結合により検出可能である。

#### 【0053】

また、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法によって得られた増幅産物は、免疫クロマトグラフなどを用いても検出が可能である。この方法では、肉眼で検出可能な標識を利用したクロマトグラフ媒体を用いることが考案されている（イムノクロマトグラフィー法）。上記増幅断片と標識プローブとをハイブリダイズさせ、該増幅断片のさらに異なる配列とハイブリダイズ可能な捕捉用プローブをクロマト媒体に固定しておけば、その固定した部分でトラップすることができ、クロマト媒体での検出が可能となる。その結果、肉眼的にシンプルな検出が可能となる。

## 【0054】

本発明による核酸増幅方法によって得られた増幅断片は通常塩基により構成されるため、増幅後、増幅断片内部の制限酵素部位を用いて適当なベクターにサブクローニングすることも可能である。さらに、RFLPのような、制限酵素を用いた処理をすることも可能であり、遺伝子検査の分野においても広く利用することができる。また、本発明による核酸増幅方法によって得られた増幅断片は通常塩基により構成されるため、増幅断片中にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を組み込んでおけば、増幅断片から直接RNAを合成することが可能となり、このRNAは、RNAプローブとして使用することもできる。

## 【0055】

さらに、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法においては、通常のdNTPの代わりに、ビオチンや蛍光物質で標識された塩基を使用することができ、これにより、ビオチンや蛍光物質で標識されたDNAプローブを調製することも可能である。

## 【0056】

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法により調製された一本鎖核酸は、DNAチップ上に固定するDNA断片として使用できる。すなわち、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法は、DNAチップ作製において固定化するDNA鎖を調製する方法にも応用が可能である。また、あらかじめ、プライマーの5'末端をあらかじめDNAチップ上に固定しておき、そのチップ上で核酸合成または核酸増幅を行ない、DNAチップを作製することも可能である。また、その核酸合成または核酸増幅を行なう前にあらかじめ蛍光標識プローブを添加しておけば、DNAチップ上で核酸合成または核酸増幅を行ないながら、リアルタイムな検出も可能となる。

## 【0057】

本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法を実施するために、必要な試薬をまとめてキットとすることができる。従って、本発明によるキットは、本発明によるプライマーまたは本発明によるプライマーセットを含んでなる。また、本発明による核酸合成方法または核酸増幅方法は、本発明によるプライマーまたは

プライマーセット以外のプライマーを必要としないという利点を有する。従って、本発明の好ましい実施態様によれば、本発明によるキットは、本発明によるプライマーまたは本発明によるプライマーセット以外のプライマー成分を含まないものとされる。本発明によるキットはさらに、上述の試薬類、反応容器、説明書等を含んでいてもよい。

#### 【0058】

##### 【実施例】

##### 例1

本例では、鋳型としてHuman DNA (Clontech社製) を使用してヒトSTS DY S 2 3 7 遺伝子の増幅を試みた。用いたプライマーは、以下に示す通りとした。これらのプライマーの合成は、エスベックオリゴサービス株式会社に依頼した。

#### 【0059】

実験に使用したプライマーの特徴を以下に記載した。また、テンプレートに対する各プライマー領域の位置関係は図2に示す通りとした。なお、下記の配列において、下線部は、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーのそれぞれにおいて共通の3' 末端領域を示す。

#### 【0060】

プライマーセット1: 鋳型にアニーリングする配列 (20mer) のみからなるプライマーの組み合わせ;

SY153L: GCATCCTCATTTTATGTCCA (配列番号1);

SY153R: CAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号2)。

#### 【0061】

プライマーセット2: 各プライマーの3' 端側にある配列 (20mer: プライマーセット1と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3' 末端残基の1塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ;

SY153LP13- 0: AAGTCTCTGATGTGCATCCTCATTTTATGTCCA (配列番号3);

SY153RP13- 0: AGAACTCGCTTTACAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号4)。



## 【0062】

プライマーセット3:各プライマーの3'端側にある配列(20mer:プライマーセット1と同様の配列)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の6塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ;

SY153LP13-5:GTATTAAGTCTCTGCATCCTCATTTTATGTCCA (配列番号5):

SY153RP13-5:CACTAAGAACTCGCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号6)。

## 【0063】

プライマーセット4:各プライマーの3'端側にある配列(20mer:プライマーセット1と同様の配列)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の11塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ;

SY153LP13-10:GTTTCAGTATTAAGGCATCCTCATTTTATGTCCA (配列番号7):

SY153RP13-10:AGCATCACTAAGACAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号8)。

## 【0064】

プライマーセット5:各プライマーの3'端側にある配列(20mer:プライマーセット1と同様の配列)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の16塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ;

SY153LP13-15:CATTGTTCAGTAGCATCCTCATTTTATGTCCA (配列番号9):

SY153RP13-15:CTTGCAGCATCACCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号10)。

## 【0065】

プライマーセット6:各プライマーの3'端側にある配列(20mer:プライマーセット1と同様の配列)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(10mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの3'末端残基の21塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプ

ライマーの組み合わせ；

SY153LP10: GGCATTGTGTCATCCTCATTTATGTCCA (配列番号 11) ；

SY153RP10: ATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 12) 。

【0066】

プライマーセット 7: 各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer: プライマーセット 1 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP13: TGTGGCATTGTGTCATCCTCATTTATGTCCA (配列番号 13) ；

SY153RP13: AACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 14) 。

【0067】

プライマーセット 8: 各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer: プライマーセット 1 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (16mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP16: TTATGTGGCATTGTGTCATCCTCATTTATGTCCA (配列番号 15) ；

SY153RP16: CTTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 16) 。

【0068】

プライマーセット 9: 各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer: プライマーセット 1 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (22mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ；

SY153LP22: TTACCTTTATGTGGCATTGTGTCATCCTCATTTATGTCCA (配列番号 17) ；

SY153RP22: ATTTAACCTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 18) 。

【0069】

プライマーセット 10: 各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer: プ

ライマーセット 1 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (25mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ;

SY153LP25: TCATTACCTTTATGTGGCATTGTGTCATCCTCATTTCATGTCCA (配列番号 19)

:

SY153RP25: AAGATTAACTTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 20)

。

#### 【0070】

プライマーセット 11: 各プライマーの 3' 端側にある配列 (20mer: プライマーセット 1 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (28mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーの組み合わせ;

SY153LP28: CAGTCATTACCTTTATGTGGCATTGTGTCATCCTCATTTCATGTCCA (配列番号 21):

SY153RP28: AAGAAGATTAACTTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA (配列番号 22)。

#### 【0071】

次の組成を有する反応液 (25  $\mu$ L): Tris-HCl (20mM, pH 8.8)、KCl (10mM)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10mM)、MgSO<sub>4</sub> (2mM)、Triton X-100 (0.1%)、dNTP (0.4mM)、それぞれ 100pmol の上記のプライマー対および 100ng の鋳型 DNA、さらに 8U の Bst DNA ポリメラーゼ (NEW ENGLAND Biolabs) を含有; を調製し、これを 60℃ で 20、40、または 60 分間インキュベートした。

#### 【0072】

各反応液 5  $\mu$ l について、3% NuSieve GTG Agarose (BioWhittaker Molecular Applications (BMA) 社製; タカラバイオ社より購入; 「NuSieve」は BMA 社

の登録商標である) にて電気泳動を行った。結果は図5、図6、および図7に示すとおりである。これらの図における各レーンのサンプルは下記の表1～3に示す通りである。

【0073】

【表1】

表1：図5の電気泳動写真における泳動レーンの説明

レーン	プライマー	テンプレート	反応時間 (分)
1	DNA size marker (20 bp ladder)		
2	プライマーセット1	有	20
3	プライマーセット1	有	40
4	プライマーセット1	有	60
5	プライマーセット1	無	60
6	プライマーセット2	有	20
7	プライマーセット2	有	40
8	プライマーセット2	有	60
9	プライマーセット2	無	60
10	プライマーセット3	有	20
11	プライマーセット3	有	40
12	プライマーセット3	有	60
13	プライマーセット3	無	60
14	プライマーセット4	有	20
15	プライマーセット4	有	40
16	プライマーセット4	有	60
17	プライマーセット4	無	60
18	プライマーセット5	有	20
19	プライマーセット5	有	40
20	プライマーセット5	有	60
21	プライマーセット5	無	60

【0074】

【表 2】

表 2 : 図 6 の電気泳動写真における泳動レーンの説明

レーン	プライマー	テンプレート	反応時間 (分)
1	DNA size marker (20 bp ladder)		
2	プライマーセット 6	有	2 0
3	プライマーセット 6	有	4 0
4	プライマーセット 6	有	6 0
5	プライマーセット 6	無	6 0
6	プライマーセット 7	有	2 0
7	プライマーセット 7	有	4 0
8	プライマーセット 7	有	6 0
9	プライマーセット 7	無	6 0
1 0	プライマーセット 8	有	2 0
1 1	プライマーセット 8	有	4 0
1 2	プライマーセット 8	有	6 0
1 3	プライマーセット 8	無	6 0
1 4	プライマーセット 9	有	2 0
1 5	プライマーセット 9	有	4 0
1 6	プライマーセット 9	有	6 0
1 7	プライマーセット 9	無	6 0
1 8	プライマーセット 1 0	有	2 0
1 9	プライマーセット 1 0	有	4 0
2 0	プライマーセット 1 0	有	6 0
2 1	プライマーセット 1 0	無	6 0

【0075】

【表 3】

表 3 : 図 7 の電気泳動写真における泳動レーンの説明

レーン	プライマー	テンプレート	反応時間 (分)
1	DNA size marker (20 bp ladder)		
2	プライマーセット 1 1	有	20
3	プライマーセット 1 1	有	40
4	プライマーセット 1 1	有	60
5	プライマーセット 1 1	無	60

## 【0076】

各図のレーン 5、9、13、17、および 21 ではテンプレートが添加されていないため、未反応のプライマーが染色されたもの以外のバンドは確認されなかった。

## 【0077】

図 5 のレーン 2 および 3 ではテンプレートが添加されているため、未反応のプライマーと高分子サイズのテンプレートのバンドが確認された。しかし、反応時間が不十分であるため、増幅産物は確認されなかった。図 5 のレーン 4 からわかるように、テンプレートが添加された反応時間 60 分のサンプルについては増幅産物が得られたが、これらは、低サイズ域がラダー状で高サイズ域がスメアー状の増幅産物であった。図 5 のレーン 2 ~ 5 では、鋳型にアニーリングするオリゴヌクレオチド (20 mer) のみからなるプライマーセット 1 を用いており、本発明による合成反応が起らなかったために、目的とする増幅産物が得られなかった。

## 【0078】

図 5 のレーン 6 以降は各プライマーの 3' 端側にある配列 (20 mer : プライマーセット 1 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、5' 端側にある配列が、そのプライマーによる伸長鎖上の、各プライマーの 3' 末端残基の下流から始まる領域にハイブリダイズするようなプライマーセットを用いて増幅を行った結

果である。

#### 【0079】

図5のレーン8および12からわかるように、プライマーセット2または3を用いた場合、60分の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約160bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

#### 【0080】

さらに、図5のレーン15および16、図6のレーン3、4、7、8、11、12、15、16、19および20、ならびに図7のレーン3および4からわかるように、プライマーセット4、6、7、8、9、10、および11を用いた場合、40分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約160bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

#### 【0081】

さらに、図5のレーン18～20からわかるように、プライマーセット5を用いた場合、20分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約160bp付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

#### 【0082】

プライマーセット2および3のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が比較的小さい場合には、同一の配列を有する次のプライマーがアニーリングすべき鋳型上の配列の大部分が二本鎖のままとなり、次のプライマーのアニーリングが困難になるために、長い反応時間が必要になると考えられる。

#### 【0083】

また、プライマーセット6～11のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が比較的大きい場合には、各プライマーの5'端側の配列が

折り返す効率が低下し、比較的長い反応時間が必要になると考えられる。

【0084】

一方で、プライマーセット5のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの3'末端側配列に相当する領域と5'末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が小さすぎず、かつ、大きすぎない距離にある時に、本発明における最も効率のよい増幅が可能となると考えられる。

【0085】

例2

本例では、鋳型としてHuman DNA (Clontech社製) を使用して s Y 1 6 0 遺伝子の増幅を試みた。用いたプライマーは、以下に示す通りとした。これらのプライマーの合成は、エスベックオリゴサービス株式会社に依頼した。

【0086】

実験に使用したプライマーの特徴を以下に記載した。また、テンプレートに対する各プライマー領域の位置関係は図3に示す通りとした。なお、下記の配列において、下線部は、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーのそれぞれにおいて共通の3'末端領域を示す。

【0087】

プライマーセット12: プライマーの3'端側にある配列(20mer)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の27塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと: プライマーの3'端側にある配列(20mer)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の21塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーの組み合わせ;

SY160LP13: ATTTCGATTCCGTTTACGGGTCCTCGAATGGAATA (配列番号23):

SY160RP13: CTAAATCGAATGGTCATTGCATTCCCTTCCATT (配列番号24)。

【0088】

プライマーセット13: プライマーの3'端側にある配列(20mer: プラ



イマーセット 12 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (16 mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 27 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと: プライマーの 3' 端側にある配列 (20 mer: プライマーセット 12 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (16 mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 21 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーの組み合わせ;

SY160LP16: GACATTCGATTCCGTTTTACGGGTCTCGAATGGAATA (配列番号 25) :

SY160RP16: GAACTAAATCGAATGGTCATTGCATTCCTTTCCATT (配列番号 26) 。

#### 【0089】

次の組成を有する反応液 (25  $\mu$ L) : Tris-HCl (20 mM, pH 8.8)、KCl (10 mM)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mM)、MgSO<sub>4</sub> (2 mM)、Triton X-100 (0.1%)、dNTP (0.4 mM)、それぞれ 100 pmol の上記のプライマー対および 100 ng の鋳型 DNA、さらに 8 U の Bst DNA ポリメラーゼ (NEW ENGLAND Biolabs) を含有; を調製し、これを 60℃ で 60 または 90 分間インキュベートした。

#### 【0090】

各反応液 5  $\mu$ l について、3% NuSieve GTG Agarose (BMA 社製; タカラバイオ社より購入; 「NuSieve」は BMA 社の登録商標である) にて電気泳動を行った。結果は図 8 に示すとおりである。これらの図における各レーンのサンプルは下記の表 4 に示す通りである。

#### 【0091】

【表 4】

表 4：図 8 の電気泳動写真における泳動レーンの説明

レーン	プライマー	テンプレート	反応時間 (分)
1	DNA size marker (20 bp ladder)		
2	プライマーセット 1 2	有	6 0
3	プライマーセット 1 2	有	9 0
4	プライマーセット 1 2	無	9 0
5	プライマーセット 1 3	有	6 0
6	プライマーセット 1 3	有	9 0
7	プライマーセット 1 3	無	9 0

## 【0092】

レーン 4 および 7 ではテンプレートが添加されていないため、未反応のプライマーが染色されたもの以外のバンドは確認されなかった。

## 【0093】

レーン 2 および 5 ではテンプレートが添加されているため、未反応のプライマーと高分子サイズのテンプレートのバンドが確認された。しかし、反応時間が不十分であるため、増幅産物は確認されなかった。レーン 3 および 6 からわかるように、テンプレートが添加された反応時間 9 0 分のサンプルについては目的とする増幅産物が十分に得られた。低サイズのバンドのうち、約 2 6 0 b p 付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

## 【0094】

例 3

本例では、鋳型として M13mp18RF DNA (ファージベクター：タカラバイオ社製) を使用して、その増幅を試みた。用いたプライマーは、以下に示す通りとした。これらのプライマーの合成は、エスベックオリゴサービス株式会社に依頼した。

## 【0095】

実験に使用したプライマーの特徴を以下に記載した。また、テンプレートに対

する各プライマー領域の位置関係は図4に示す通りとした。なお、下記の配列において、下線部は、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーのそれぞれにおいて共通の3'末端領域を示す。

【0096】

プライマーセット14：プライマーの3'端側にある配列(24mer)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(24mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の51塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(22mer)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(25mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の54塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13BIP：CGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号27)

:

M13FIP：ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC (配列番号28)

。

【0097】

プライマーセット15：プライマーの3'端側にある配列(24mer：プライマーセット14と同様の配列)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の1塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと：プライマーの3'端側にある配列(22mer：プライマーセット14と同様の配列)が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5'端側にある配列(13mer)が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの3'末端残基の1塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ；

M13F2L13- 0：GTGTGAAATTGTTTGTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号29)：

M13R2L13- 0：TTCGCCAGCTGGCGTGGGGCCTCTTCGCTATTAC (配列番号30)。

【0098】

プライマーセット 16: プライマーの 3' 端側にある配列 (24mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 7 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと: プライマーの 3' 端側にある配列 (22mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 7 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ;

M13F2L13-6: TTTCCTGTGTGAATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号 31):

M13R2L13-6: CCCCCTTTCGCCAGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC (配列番号 32)。

#### 【0099】

プライマーセット 17: プライマーの 3' 端側にある配列 (24mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 13 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと: プライマーの 3' 端側にある配列 (22mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 13 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ;

M13F2L13-12: TAGCTGTTTCCTGTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号 33):

M13R2L13-12: AGCACATCCCCCTGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC (配列番号 34)。

#### 【0100】

プライマーセット 18: プライマーの 3' 端側にある配列 (24mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 19 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと: プライマーの 3' 端側にある配列 (22mer: プライマー

セット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 19 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ;

M13F2L13-18: TGGTCATAGCTGTTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号 35):

M13R2L13-18: CCTTGCAGCACATGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC (配列番号 36)。

#### 【0101】

プライマーセット 19: プライマーの 3' 端側にある配列 (24mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 25 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと: プライマーの 3' 端側にある配列 (22mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (13mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 23 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ;

M13F2L13: TAATCATGGTCATTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号 37):

M13R3L13: TCGCCTTGCAGCAGTGC GGCCCTCTTCGCTATTAC (配列番号 38)。

#### 【0102】

プライマーセット 20: プライマーの 3' 端側にある配列 (24mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (23mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 25 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなセンスプライマーと: プライマーの 3' 端側にある配列 (22mer: プライマーセット 14 と同様の配列) が鋳型にアニーリングし、伸長反応の後、5' 端側にある配列 (23mer) が、そのプライマーによる伸長鎖上の、プライマーの 3' 末端残基の 23 塩基下流から始まる領域にハイブリダイズするようなアンチセンスプライマーとの組み合わせ;

M13F2L23: CTCGAATTCGTAATCATGGTCATTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT (配列番号 39)

) :

M13R3L23 : CCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAGTGC~~GGGCCTCTTCGCTATTAC~~ (配列番号 40)

。

#### 【0103】

次の組成を有する反応液 (25  $\mu$ L) : Tris-HCl (20 mM, pH 8.8)、KCl (10 mM)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mM)、MgSO<sub>4</sub> (2 mM)、Triton X-100 (0.1%)、dNTP (0.4 mM)、それぞれ 100 pmol の上記のプライマー対および 0.05  $\mu$ g の鋳型 DNA、さらに 8 U の Bst DNA ポリメラーゼ (NEW ENGLAND Biolabs) を含有；を調製し、これを 65℃ で 20～120 分間インキュベートした。

#### 【0104】

各反応液 5  $\mu$ l について、3% NuSieve GTG Agarose (BMA 社製；タカラバイオ社より購入；「NuSieve」は BMA 社の登録商標である) にて電気泳動を行った。結果は図 9 および図 10 に示すとおりである。これらの図における各レーンのサンプルは下記の表 5 に示す通りである。

#### 【0105】

【表 5】

表 5 : 図 9 の電気泳動写真における泳動レーンの説明

レーン	プライマー	テンプレート	反応時間 (分)
1	DNA size marker (20 bp ladder)		
2	プライマーセット 1 4	有	6 0
3	プライマーセット 1 4	有	9 0
4	プライマーセット 1 4	有	1 2 0
5	プライマーセット 1 4	無	1 2 0
6	プライマーセット 1 5	有	6 0
7	プライマーセット 1 5	有	9 0
8	プライマーセット 1 5	有	1 2 0
9	プライマーセット 1 5	無	1 2 0
1 0	プライマーセット 1 6	有	2 0
1 1	プライマーセット 1 6	有	4 0
1 2	プライマーセット 1 6	有	6 0
1 3	プライマーセット 1 6	無	6 0
1 4	プライマーセット 1 7	有	2 0
1 5	プライマーセット 1 7	有	4 0
1 6	プライマーセット 1 7	有	6 0
1 7	プライマーセット 1 7	無	6 0
1 8	プライマーセット 1 8	有	2 0
1 9	プライマーセット 1 8	有	4 0
2 0	プライマーセット 1 8	有	6 0
2 1	プライマーセット 1 8	無	6 0

【0 1 0 6】

【表 6】

表 6 : 図 10 の電気泳動写真における泳動レーンの説明

レーン	プライマー	テンプレート	反応時間 (分)
1	DNA size marker (20 bp ladder)		
2	プライマーセット 19	有	20
3	プライマーセット 19	有	40
4	プライマーセット 19	有	60
5	プライマーセット 19	無	60
6	プライマーセット 20	有	20
7	プライマーセット 20	有	40
8	プライマーセット 20	有	60
9	プライマーセット 20	無	60

## 【0107】

各図のレーン 5、9、13、17、および 21 ではテンプレートが添加されていないため、未反応のプライマーが染色されたもの以外のバンドは確認されなかった。

## 【0108】

図 9 のレーン 3 および 4 ではテンプレートが添加されており、反応時間 90 分以上で増幅産物が得られた。しかし、これは、目的のサイズとは異なる低サイズのラダー状の増幅産物であった。これらのレーンでは、増幅反応にプライマーセット 14 が用いられている。そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの 3' 末端側配列に相当する領域と 5' 末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔は、センスプライマーでは 50 ヌクレオチドであり、アンチセンスプライマーでは 53 ヌクレオチドである。このことから、プライマー伸長鎖上における、プライマーの 3' 末端側配列に相当する領域と 5' 末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が過度に大きくなると、各プライマーの 5' 端側にある配列が折り返す効率が顕著に低下し、本発明の合成反応が起こりにくくなるために、目的



とする増幅産物が得られなかったものと考えられる。

#### 【0 1 0 9】

図 9 のレーン 7 からわかるように、プライマーセット 1 5 を用いた場合、9 0 分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約 2 4 0 b p 付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

#### 【0 1 1 0】

さらに、図 9 のレーン 1 2 および 1 6、ならびに図 1 0 のレーン 4 および 8 からわかるように、プライマーセット 1 6、1 7、1 9、および 2 0 を用いた場合、6 0 分の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約 2 4 0 b p 付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

#### 【0 1 1 1】

さらに、図 9 のレーン 1 9 からわかるように、プライマーセット 1 8 を用いた場合、4 0 分以上の反応時間で目的増幅産物を得ることが可能であった。低サイズのバンドのうち、約 2 4 0 b p 付近のバンドは、本発明の合成反応により予想される産物である。

#### 【0 1 1 2】

プライマーセット 1 5 のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの 3' 末端側配列に相当する領域と 5' 末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が小さい場合には、同一の配列を有する次のプライマーがアニーリングすべき鋳型上の配列の大部分が二本鎖のままとなり、次のプライマーのアニーリングが困難になるために、長い反応時間が必要になると考えられる。

#### 【0 1 1 3】

また、プライマーセット 1 9 および 2 0 のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの 3' 末端側配列に相当する領域と 5' 末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が大きい場合には、各プライマーの 5' 端側の配列が折り返す効率が低下し、比較的長い反応時間が必要になると考えられる。

#### 【0 1 1 4】

一方で、プライマーセット 18 のように、そのプライマー伸長鎖上における、プライマーの 3' 末端側配列に相当する領域と 5' 末端側配列がハイブリダイズする領域との間隔が小さすぎず、かつ、大きすぎない距離にある時に、本発明における最も効率のよい増幅が可能となると考えられる。

#### 【0115】

##### 例 4

例 1～3 で得られた増幅産物のうち、それぞれのターゲットごとに最も増幅効率が良かったと思われる増幅産物を用い、制限酵素で消化した。例 1 に記載のプライマーセット 5 を用いて得られた増幅産物の反応液 1  $\mu$  L を制限酵素 M b o I で消化し、例 2 に記載のプライマーセット 12 を用いて得られた増幅産物の反応液 1  $\mu$  L を制限酵素 B s t X I で消化し、例 3 に記載のプライマーセット 18 を用いて得られた増幅産物の反応液 1  $\mu$  L を制限酵素 P s t I で消化した。制限酵素消化の条件は、37℃で3時間とした。

#### 【0116】

各消化物について、3% NuSieve GTG Agarose (BMA社製; タカラバイオ社より購入; 「NuSieve」はBMA社の登録商標である) にて電気泳動を行った。結果は図 11、図 12、および図 13 に示すとおりである。それぞれの塩基配列から推測される各制限酵素消化断片のサイズは、泳動写真の横に記したとおりである。未消化でのバンドのほとんどが消化後に推定されるサイズのバンドへ変化したことから、目的の増幅産物が得られていることが確認された。

#### 【0117】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

K.K. Dnaform

Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for Amplification of Nucleic Acids

<130> 139124

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 1

gcacccctcat tttatgtcca

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 2

caacccaaaa gcactgagta

20

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

aagtctctga tgtgcatcct cattttatgt cca

33

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

agaactcgct ttacaacca aaagcactga gta

33

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gtattaagtc tctgcatcct cattttatgt cca

33

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

cactaagaac tcgcaaccca aaagcactga gta

33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

gttcagtatt aaggcatcct cattttatgt cca

33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

agcatcacta agacaaccca aaagcactga gta

33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

catttggtca gtagcatcct cattttatgt cca

33

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

cttgcagcat caccaaccca aaagcactga gta

33

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 11

ggcatttggt gcacccatcat tttatgtcca

30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 12

atcttgcagc caacccaaaa gcactgagta

30

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13

tgtggcattt gttgcatcct cattttatgt cca

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 14

aacatcttgc agccaacca aaagcactga gta

33

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 15

ttatgtggca tttgttgcac cctcatttta tgtcca

36

<210> 16



<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

cttaacatct tgcagccaac ccaaaagcac tgagta

36

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

ttacctttat gtggcatttg ttgcatcctc attttatgtc ca

42

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 18

atttaactta acatcttgca gccaacccaa aagcactgag ta

42

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 19

tcattacctt tatgtggcat ttgttgcac ctcattttat gtcca

45

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 20

aagatttaac ttaacatctt gcagccaacc caaaagcact gagta

45

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21

cagtcattac ctttatgtgg catttgttgc atcctcattt tatgtcca 48

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 22

aagaagattt aacttaacat cttgcagcca acccaaaagc actgagta 48

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23

attcgattcc gtttacgggt ctcgaatgga ata 33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 24

ctaaatcgaa tggtcattgc attcctttcc att

33

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

gacattcgat tccgtttacg ggtctcgaat ggaata

36

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26

gaactaaatc gaatggatcat tgcattcctt tccatt

36

<210> 27

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 27

cgactctaga ggatccccgg gtactgttgt gtggaattgt gagcggat

48

<210> 28

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 28

acaacgtcgt gactgggaaa accctgtgcg ggcctcttcg ctattac

47

<210> 29

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 29

gtgtgaaatt gtttgttgtg tggaattgtg agcggat

37

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 30

ttcgccagct ggcgtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 31

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 31

tttcctgtgt gaatgttgtg tggaattgtg agcggat

37

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 32

ccccctttcg ccagtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 33

tagctgtttc ctgtgttgtg tggaattgtg agcggat

37

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 34

agcacatccc cctgtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 35

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 35

tggtcatagc tgttgttgtg tggaattgtg agcggat

37

<210> 36

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 36

ccttcagca catgtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 37

<211> 37



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 37

taatcatggg cattgttgtg tggaattgtg agcggat

37

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 38

tcgccttgca gcagtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 39

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 39

ctcgaattcg taatcatggg cattgttgtg tggaattgtg agcggat

47

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 40

cccaacttaa tcgccttgca gcagtgcggg cctcttcgct attac

45

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 41

agcatcctca ttttatgtcc aacatcagag acttaatact gaacaaatgc cacataaagg 60

taatgactgt tgaagaagat ttaacttaac atcttgcagc atcactaaga actcgcttta 120

tactcagtgc ttttgggttg

140

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<221> unsure

<222> (48)

<223> n is unknown

<400> 42

gctacgggtc tcgaatggaa taaaaatata tggaatggaa tgcaatgnaa cggaatcgaa 60  
tgtcatagaa tgtaatgcaa tgcaaaaaca tggaatccaa aatcattgac tggaaaggct 120  
gggtgtcgaa aggaattgac tccaatggaa tggaatcgaa tggaatggaa gtgaatagaa 180  
tcgaactaaa tcgaatggaa tggaattgat aggaacggaa tggaaaggaa tgcaatgatt 240

<210> 43

<211> 300

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Phage vector

<400> 43

cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 60  
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 120  
cggtaaccgg ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggca ctggccgtcg 180  
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac 240  
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac 300

# 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

本発明による核酸増幅方法を模式的に示した図である。

## 【図 2】

ヒトSTS DYS 237 遺伝子の増幅に用いたプライマーの5'側の配列と3'側の配列の、該遺伝子上での位置を示す図である。

## 【図 3】

sY160 遺伝子の増幅に用いたプライマーの5'側の配列と3'側の配列の、該遺伝子上での位置を示す図である。

## 【図 4】

M13mp18RT DNAの増幅に用いたプライマーの5'側の配列と3'側の配列の、該DNA上での位置を示す図である。

## 【図 5】

各種条件下におけるヒトSTS DYS 237 遺伝子の増幅の結果を示す図である。

## 【図 6】

各種条件下におけるヒトSTS DYS 237 遺伝子の増幅の結果を示す図である。

## 【図 7】

各種条件下におけるヒトSTS DYS 237 遺伝子の増幅の結果を示す図である。

## 【図 8】

各種条件下における sY160 遺伝子の増幅の結果を示す図である。

## 【図 9】

各種条件下におけるM13mp18RT DNAの増幅の結果を示す図である。

## 【図 10】

各種条件下におけるM13mp18RT DNAの増幅の結果を示す図である。

## 【図 11】

ヒトSTS DYS 237 遺伝子からの増幅産物を制限酵素処理して得られる泳動パターンを示す図である。

## 【図 1 2】

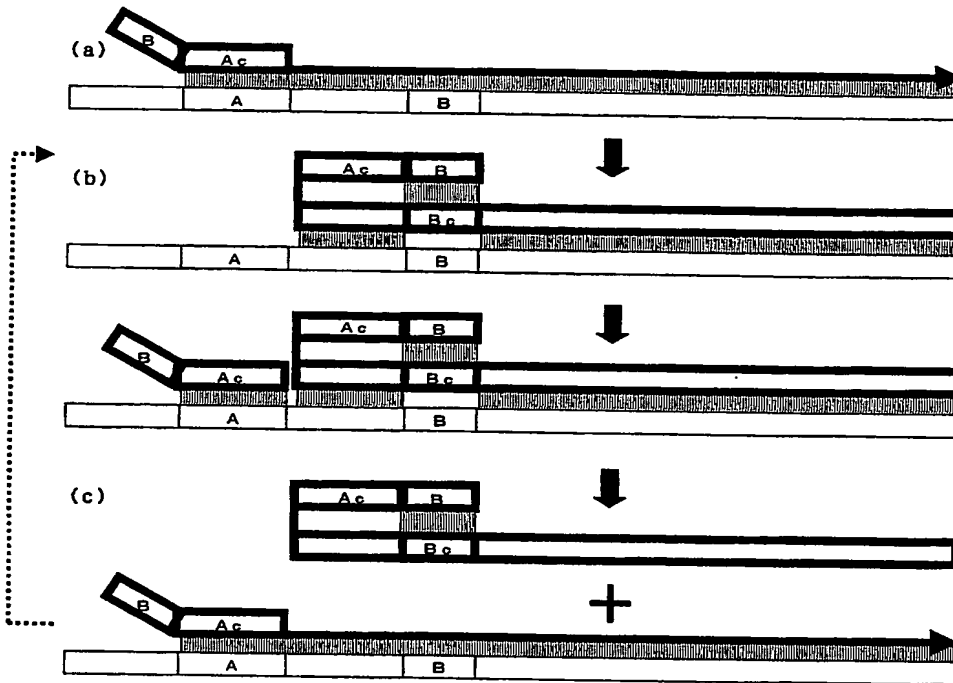
s Y 1 6 0 遺伝子からの増幅産物を制限酵素処理して得られる泳動パターンを示す図である。

## 【図 1 3】

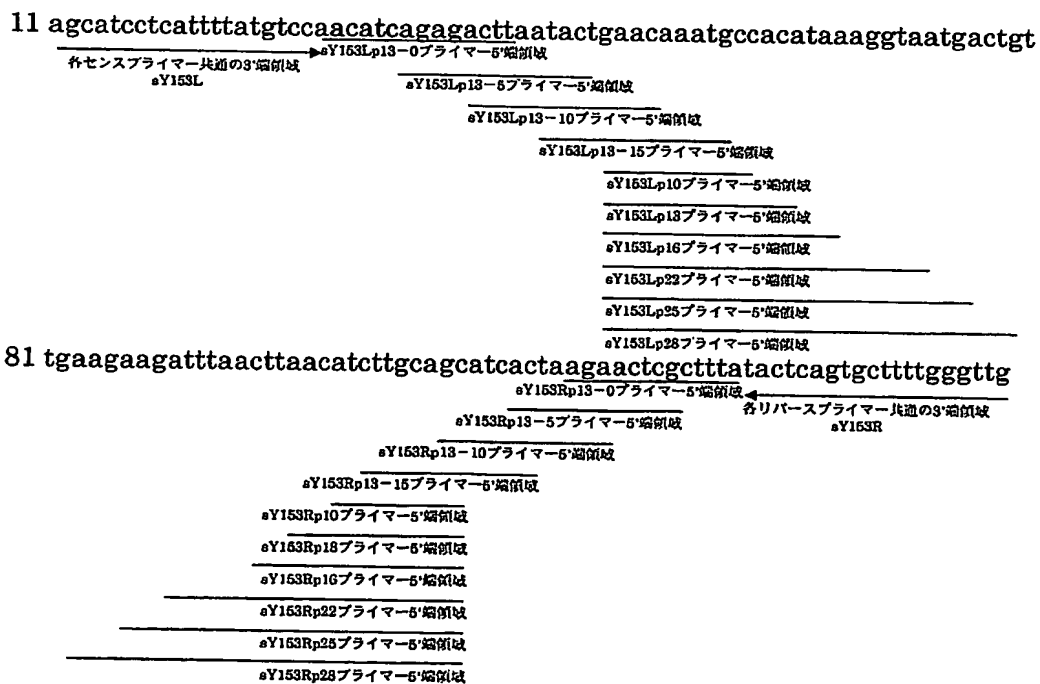
M 1 3 m p 1 8 R T D N A からの増幅産物を制限酵素処理して得られる泳動パターンを示す図である。

【書類名】 図面

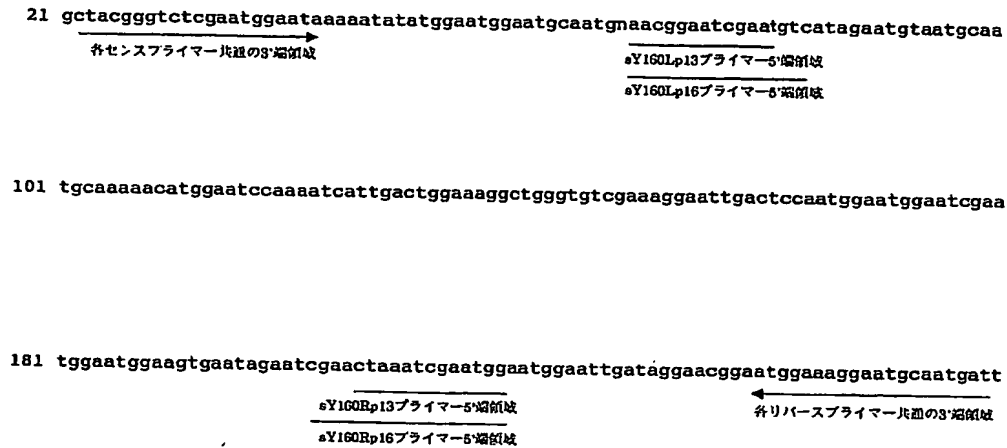
【図 1】



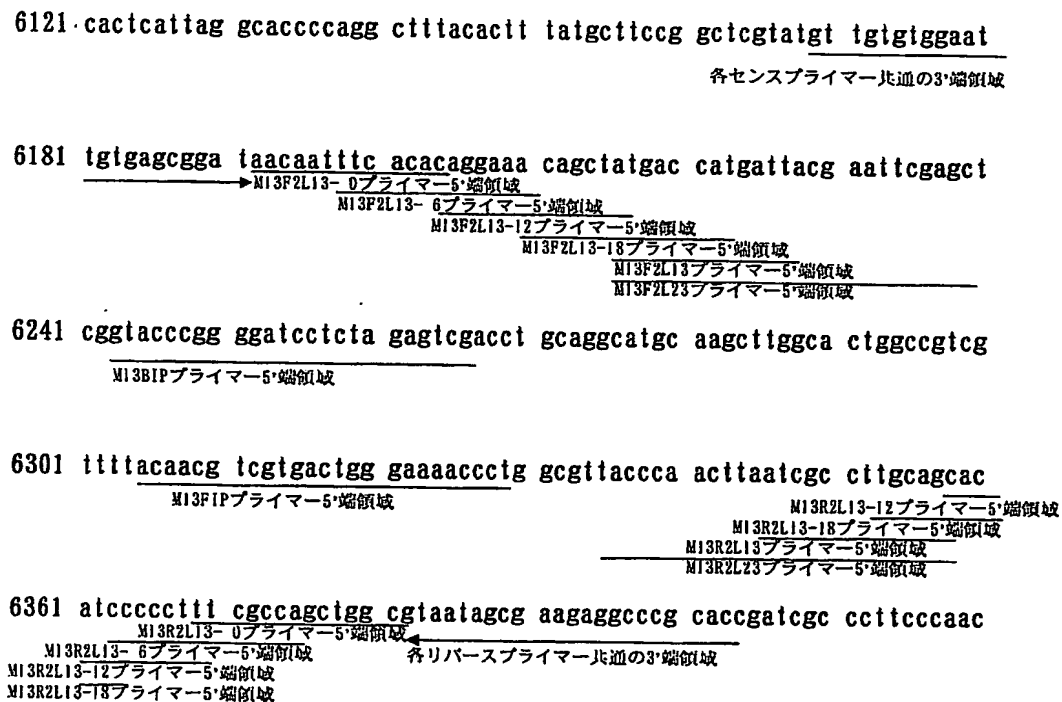
【図 2】



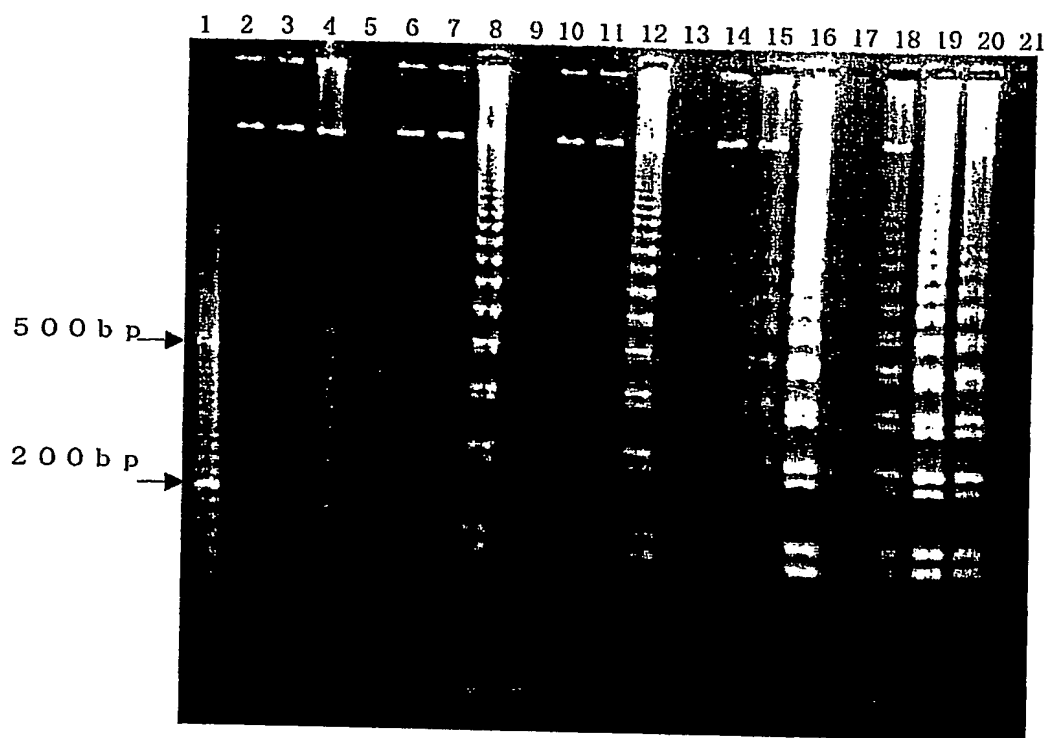
## 【図 3】



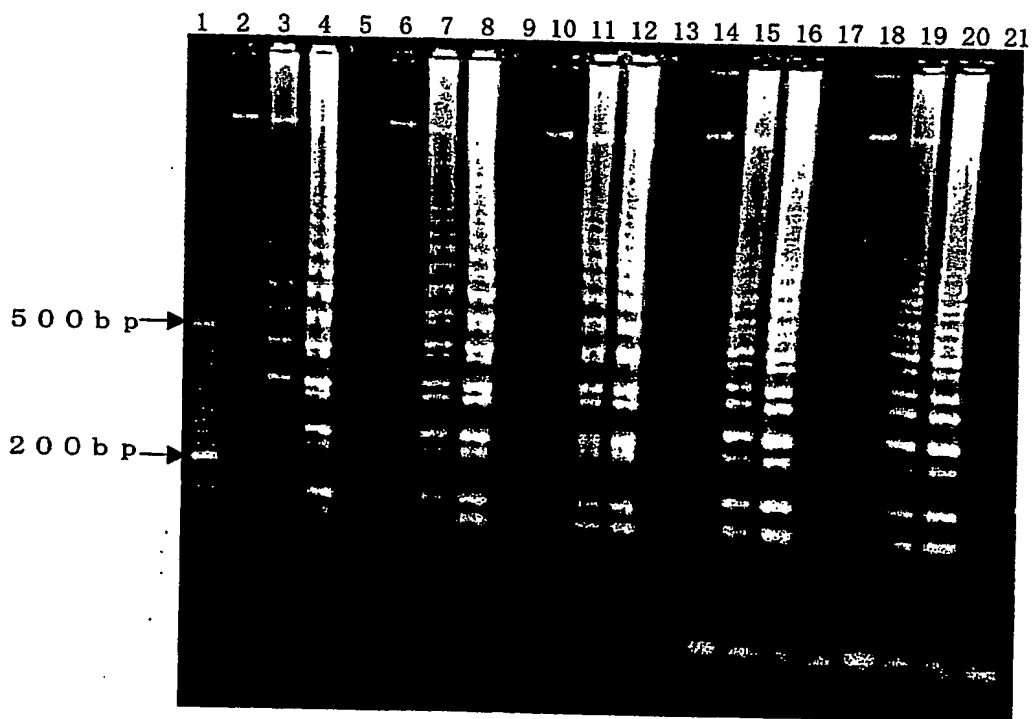
## 【図 4】



【図 5】

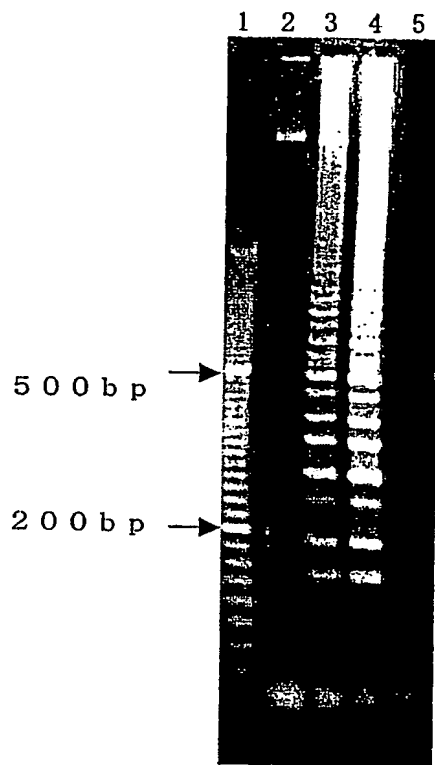


【図 6】

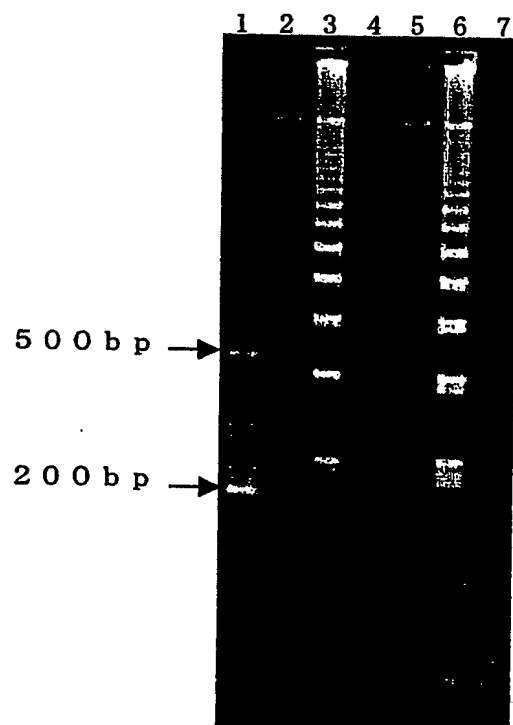




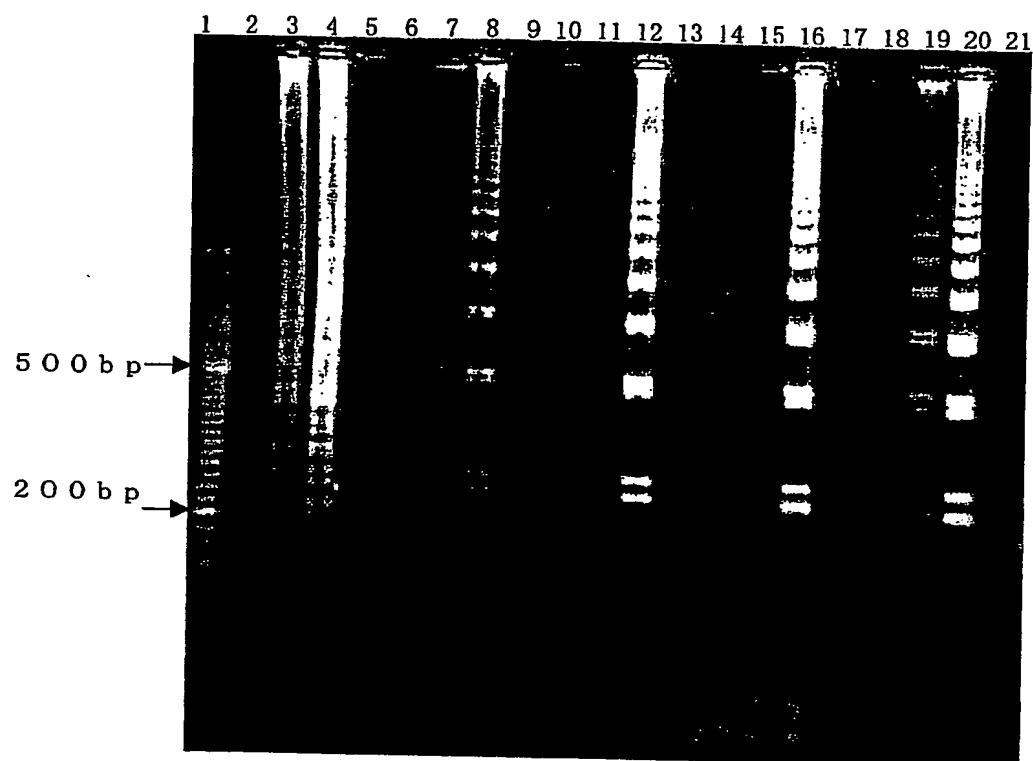
【図 7】



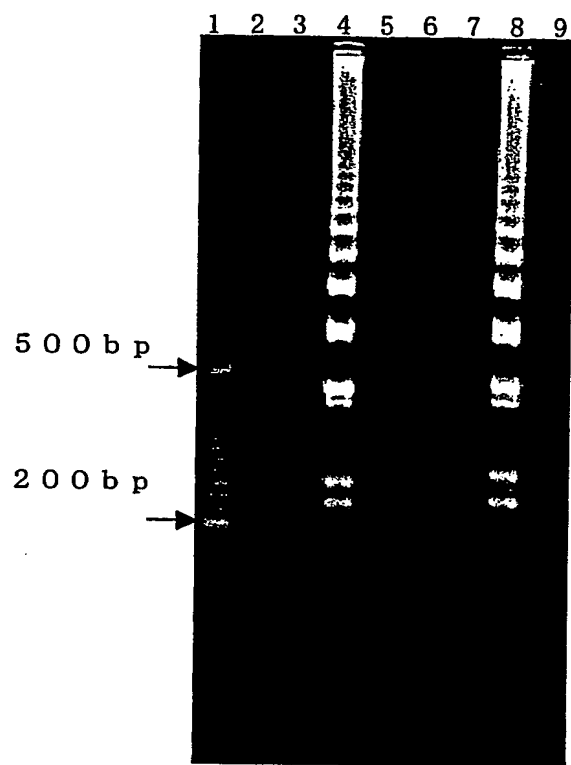
【図 8】



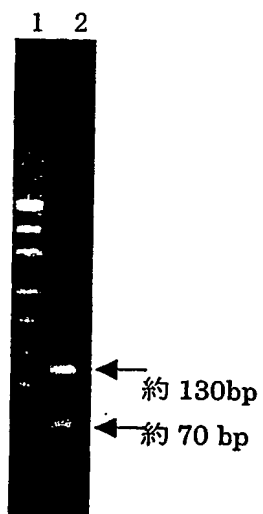
【図 9】



【図10】



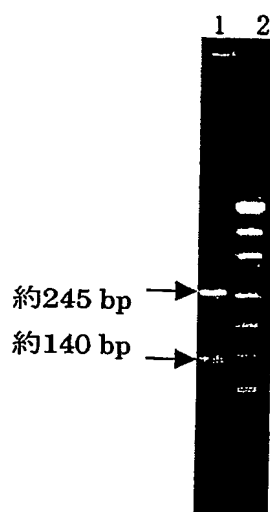
【図11】



レーン1 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

レーン2 : 制限酵素処理されたヒトSTS DYS237の増幅産物

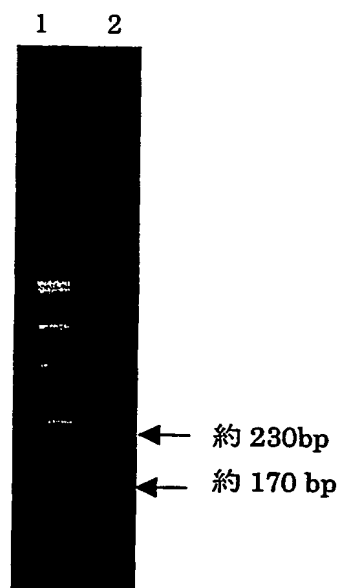
【図 12】



レーン 1 : 制限酵素処理された s Y 1 6 0 の増幅産物

レーン 2 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

【図 13】



レーン 1 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

レーン 2 : 制限酵素処理された M 1 3 m p 1 8 の増幅産物

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標的核酸配列を含む核酸を効率的に合成または増幅する方法の提供。

【解決手段】 標的核酸配列の3'末端部分の配列(A)にハイブリダイズする配列(Ac')を3'末端部分に含んでなり、標的核酸配列において前記配列(A)よりも5'側に存在する配列(B)の相補配列(Bc)にハイブリダイズする配列(B')を前記配列(Ac')の5'側に含んでなるプライマーであって、

前記配列(Ac')の塩基数をXとし、標的核酸配列中における前記配列(A)と前記配列(B)に挟まれた領域の塩基数をYとし、前記配列(Ac')と前記配列(B')との間の介在配列の塩基数をY' (Y'は0であり得る)としたときに、 $\{X - (Y - Y')\} / X$ が $-1.00 \sim 1.00$ の範囲にあるプライマーを使用する。

【選択図】 図1

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)  
【整理番号】 13912488  
【提出日】 平成15年10月16日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2002-314776  
【承継人】  
【識別番号】 503359821  
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号  
【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100075812  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 吉 武 賢 次  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100091487  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中 村 行 孝  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100094640  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 紺 野 昭 男  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100107342  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 横 田 修 孝  
【提出物件の目録】  
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1  
【提出物件の特記事項】 手続補足書で提出します。  
【物件名】 委任状 1  
【提出物件の特記事項】 手続補足書で提出します。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-314776
受付番号	50301719810
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成 15 年 12 月 11 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【承継人】

【識別番号】 503359821

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100075812

【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3-2-3 協和特許法律事務所

【氏名又は名称】 吉武 賢次

【選任した代理人】

【識別番号】 100091487

【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許法律事務所

【氏名又は名称】 中村 行孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100094640

【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3-2-3 富士ビル 協和特許法律事務所

【氏名又は名称】 紺野 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100107342

【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許法律事務所

【氏名又は名称】 横田 修孝

特願 2002-314776

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

1990年 8月28日  
新規登録  
埼玉県和光市広沢2番1号  
理化学研究所



特願 2002-314776

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[501293666]

1. 変更年月日

2002年 3月26日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都港区三田1丁目3番35号

氏 名

株式会社ダナフォーム

特願 2002-314776

出願人履歴情報

識別番号

[000250100]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

1994年10月11日  
住所変更  
大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号  
湧永製薬株式会社

特願2002-314776

出願人履歴情報

識別番号

[503359821]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名

独立行政法人理化学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**